

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μεταγευματική μεταβολή των εντερικών μικροβιακών κοινοτήτων
ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*)**

**ΟΝΟΜΑ: Ζαχαράκης Απόστολος
Α.Μ: 1346**

Βόλος, Ιανουάριος 2016

**Μεταγευματική μεταβολή των εντερικών μικροβιακών κοινοτήτων
ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*)**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Έλενα Μεντέ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Φυσιολογία θρέψης ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα

Κωνσταντίνος Κορμάς, Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος

Ευθυμία Αντωνοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μέλος

Στον αγαπητό φίλο και συνάδελφο Μιχάλη Τριανταφύλλου

&

στον ξάδερφό μου Alessandro J. Pasquale

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής διατριβής μου την κ. Ε.Μεντέ για την καθοδήγηση και την υποστήριξη που μου έδωσε σε όλη την διάρκεια της προσπάθειας μου για την περάτωση της πτυχιακής διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κ.Κορμά και την κ. Ε.Αντωνοπούλου για την βοήθεια τους κατά την ερευνητική διαδικασία. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ε.Νικούλη για την βοήθεια της στο πείραμα και για τις χρήσιμες συμβουλές που μου έδωσε κατά την συγγραφής της παρούσας εργασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την κατανόηση και την συμπαράσταση που μου έδειξαν στο χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT	7
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1.Βιολογία και γενικά στοιχεία εκτροφής ιριδίζουσας πέστροφας	8
1.1.1 Συστηματική κατάταξη	8
1.1.2 Μορφολογία	8
1.1.3. Χρωματισμός.....	8
1.1.4 Οικολογία	9
1.1.5 Γεωγραφική Κατανομή.....	10
1.1.6 Εκτροφή Ιριδίζουσας Πέστροφας.....	10
1.1.7 Διατροφή ιριδίζουσας πέστροφας στο περιβάλλον & στις υδατοκαλλιέργειες	11
1.2.Ο γαστρεντερικός σωλήνας των ψαριών	11
1.2.1 Εισαγωγή.....	11
1.2.2 Ανατομία του γαστρεντερικού σωλήνα	13
1.2.3 Στομάχι & πρόσθιο έντερο	13
1.2.4 Έντερο.....	14
1.2.5 Ιοί.....	15
1.2.6 Θρέψη	15
1.2.7 Προβιοτικοί οργανισμοί.....	16
1.2.8 Σκοπός.....	16
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	17
2.1 Στατιστική Επεξεργασία	18
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	19
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	24
5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	35
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	36

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μικροβίωμα του εντέρου των ιχθύων συμβάλλει στην πέψη και μπορεί να επηρεάσει τα διατροφή, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, τη συνολική δυναμική του πληθυσμού και την ευπάθεια των ψαριών. Ως εκ τούτου, αυτή η μικροβιακή κοινότητα είναι ιδιαίτερα σημαντική για την πρακτική της υδατοκαλλιέργειας. Οι πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα των τεχνολογιών της αλληλούχισης του DNA έδωσαν την δυνατότητα για ευρύτερη κατανόηση των πολύπλοκων μικροβιακών κοινοτήτων που συνδέονται με διάφορα ενδιαίτηματα. Αυτές οι πρόσφατες εξελίξεις έχουν διευρύνει ουσιαστικά τη γνώση και για τη βακτηριακή κοινότητα στο γαστρεντερικό σύστημα διαφόρων ειδών για την κατανόηση των ποικίλων παραγόντων παραγόντων που επηρεάζουν τον ξενιστή, συμπεριλαμβανομένου των διακυμάνσεων της θερμοκρασίας, αλατότητας, αναπτυξιακού σταδίου, την φυσιολογία πέψης και τη στρατηγική σίτισης. Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή προσδιορίστηκε η βακτηριακή ποικιλότητα του γαστρεντερικού συστήματος εκτρεφόμενων ατόμων πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) 3 ώρες μετά από ένα γεύμα. Στα αποτελέσματα μας δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων σε κάθε ώρα δειγματοληψίας. Στην h=0 παρατηρήθηκαν κοινά 13 OTUs (Operational Taxonomic Units) και στις τρεις επαναληψιμότητες. Στην πρώτη επαναληψιμότητα μοναδικά ήταν 22 OTUs, στην δεύτερη 12 και στην τρίτη 24 OTUs. Έπειτα από τρεις ώρες μετά το γεύμα που έγινε δειγματοληψία κοινά OTUs και για τις τρεις επαναληψιμότητες ήταν μόνο 5, ενώ στην πρώτη επαναληψιμότητα 10 OTUs ήταν μοναδικά. Στην δεύτερη μοναδικά ήταν 22 OTUs και στην τρίτη επαναληψιμότητα μοναδικό OTU ήταν μόνο ένα. Η παρούσα πτυχιακή παρουσίασε νέα αποτελέσματα στον τομέα της φυσιολογίας θρέψης των ψαριών και προάγει την επιστημονική μελλοντική έρευνα σχετικά με το γαστρεντερικό σύστημα των ιχθύων

ABSTRACT

The fish gut microbiome helps digestion and can affect nutrition and growth of fish. Therefore, the gut microbial community is important for aquaculture. Recent developments in molecular techniques gave the opportunity for a wider understanding of the complex gut bacterial communities associated with different species. This Thesis examined the changes of the gut bacterial communities of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following a single meal, 3h after feeding. The fish were fasted for 24h and a group was used as the pre-feeding group (0h group) and the remaining were fed and at 3h after feeding a group was used (3h group). A total of 90 bacterial operational taxonomic units Operational Taxonomic Units, (OTUs) were revealed. The results showed that a single meal could cause a shift in dominant OTUs at the gut of the fish. Further research on fish gut microbiome is needed to advance our knowledge on these issues.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Βιολογία και γενικά στοιχεία εκτροφής ιριδίζουσας πέστροφας

1.1.1 Συστηματική κατάταξη

Οικογένεια : Salmonidae

Γένος : *Oncorhynchus*

Είδος : *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792)

Κοινό όνομα : Ιριδίζουσα πέστροφα, αμερικάνικη πέστροφα

1.1.2 Μορφολογία

Η ιριδίζουσα πέστροφα είναι τυπικό ψάρι των εσωτερικών υδάτων (Edsall et al., 1991). Χαρακτηρίζεται από επίμηκες σώμα και η αναλογία ολικού μήκους και ύψους σώματος είναι συνήθως 5:1. Το σώμα της είναι πιο πλατύ από εκείνο της κοινής πέστροφας (Φώτης, 2003). Το κεφάλι της είναι μικρό σε σχέση με το μέγεθος της, αλλά μπορεί να ποικίλει με το στάδιο ωριμότητας και το φύλλο. Τα βράγχια της αποτελούνται από 16-22 βραγχιάκανθες στο πρώτο βραγχιακό τόξο (Νεοφύτου, 1997). Οι ακτίνες των πτερυγίων δεν μεταβάλλονται μεταξύ των ποικιλιών. Το ραχιαίο πτερύγιο έχει 14-15 ακτίνες, τα θωρακικά 13-14, το ουραίο 11, τα κοιλιακά 12-14 και αριθμός των σπονδύλων κυμαίνεται σε 61-62 (Billard, 1985, Πάσχος, 2002). Η ανάπτυξη της είναι σχετικά γρήγορη εφόσον τρέφεται με σωστή διατροφή. Τον πρώτο χρόνο το μήκος της φτάνει κάτω από συνθήκες εκτροφής τα 10-15 cm, ενώ στη χώρα μας φτάνει τα 17-22 cm. Το μέσο μήκος της στη φύση είναι 25-35 cm με μέγιστο τα 70 cm (Νεοφύτου, 1997).

1.1.3. Χρωματισμός

Το χρώμα της ιριδίζουσας πέστροφας ποικίλει, (Πάσχος, 2002). Είναι ένα ψάρι με λαμπερούς και άφθονους χρωματισμούς. Ο χρωματισμός του στην ραχιαία περιοχή είναι σκούρος κυανοπράσινος. Στα πλευρά του ψαριού διακρίνονται έντονοι ροζ αποχρώσεις οι οποίες σχηματίζουν μία λωρίδα η οποία υπάρχει κατά μήκος κάθε πλευράς από το κεφάλι μέχρι την ουρά (Νεοφύτου, 1997). Η ιριδίζουσα αυτή λωρίδα γίνεται εντονότερη την περίοδο της αναπαραγωγής. Η κοιλιακή περιοχή είναι

φωτεινότερη και συνήθως ασημένια. Σε όλο το μήκος του σώματος του ψαριού υπάρχουν σκούρες μαύρες κηλίδες (Εικόνα 1).



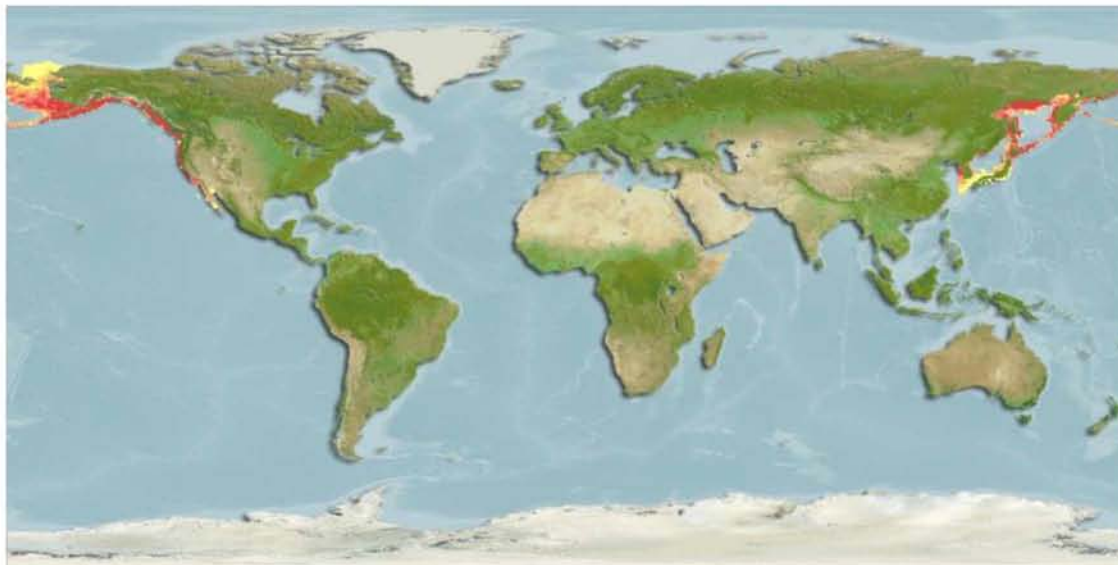
Εικόνα 1:Ιριδίζουσα πέστροφα [*Oncorhynchus mykiss*, (Walbaum 1972)]
(fishbase.org)

1.1.4 Οικολογία

Η ιριδίζουσα πέστροφα είναι ψάρι εσωτερικών υδάτων με μεγάλες απαιτήσεις σε οξυγόνο και καλής ποιότητας νερό ($7-8\text{mg/l}^{-1}$) αν και μπορεί να προσαρμοστεί και σε υφάλμυρα νερά (fishbase.org: Παπουτσόγλου, 2008, Πάσχος, 2002). Το εύρος θερμοκρασιών στο οποίο έχει την ικανότητα να επιβιώσει είναι $3-18^{\circ}\text{C}$. Σχετικές έρευνες που έχουν γίνει αναφέρουν ότι το ιδανικό εύρος θερμοκρασιών που χρειάζεται για σωστή ανάπτυξη είναι από 10°C έως 17°C (Φώτης, 2003: Παπουτσόγλου 2008).

1.1.5 Γεωγραφική Κατανομή

Η ιριδίζουσα πέστροφα είναι ένα αυτόχθονο είδος στα εσωτερικά ύδατα στην περιοχή του Ειρηνικού και στο Βόρειο τμήμα της Αμερικής από την Αλάσκα έως και το Μεξικό (Εικόνα 2)(Κλαουδάτος 2012). Το συγκεκριμένο είδος μεταφέρθηκε από την Βόρεια Αμερική στην Ευρώπη στα τέλη του 19^{ου} αιώνα και προσαρμόστηκε εύκολα όπου και μετέπειτα εγκαταστάθηκε και ευδοκimeί μέχρι και σήμερα (Φώτης 2003).



Εικόνα 2:Γεωγραφική Κατανομή της ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) (fishbase.org)

1.1.6 Εκτροφή Ιριδίζουσας Πέστροφας

Η ιριδίζουσα πέστροφα έχει μεγάλη ιστορία στις υδατοκαλλιέργειες καθώς επιτεύχθηκε η τεχνητή της αναπαραγωγή μόλις το 1842(Πάσχος 2003). Το είδος *Oncorhynchus mykiss* έχει μεγάλες προσαρμοστικές ικανότητες και μπορεί να εκτραφεί σε κλειστές δεξαμενές, σε ποτάμια καθώς και σε θαλασσινό νερό με μικρές αλατότητες ακολουθώντας την διατροφή του σολωμού (ec.europa.eu : Κλαουδάτος 2012). Ο ρυθμός ανάπτυξης καθορίζεται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού καθώς και από τις συνθήκες στις οποίες εκτρέφεται (π.χ. εντατικές ή εκτατικές εκτροφές). Εκτός των παραπάνω παραμέτρων σημαντικό ρόλο, στον ρυθμό ανάπτυξης της πέστροφας, παίζει και η πυκνότητα εκτροφής της (Παπουτσόγλου 2008). Την τελευταία δεκαετία η ιριδίζουσα πέστροφα έχει καταφέρει να εκτραφεί στις περισσότερες χώρες του κόσμου(Ιαπωνία, Γαλλία, Ισπανία, Δανία, ΗΠΑ, κλπ)

σε ενταντικές εκτροφές και πιο συγκεκριμένα σε τιμεντένια υδροστάσια στα οποία παρέχεται συνεχής ροή νερού(Κλαουδάτος 2012).

1.1.7 Διατροφή ιριδίζουσας πέστροφας στο περιβάλλον & στις υδατοκαλλιέργειες

Η διατροφή της ιριδίζουσας πέστροφας χαρακτηρίζεται κυρίως από πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη και βιταμίνες. Όλα τα παραπάνω στο φυσικό περιβάλλον συναντώνται στους περισσότερους ζωικούς οργανισμούς οι οποίοι αποτελούν την βασική διαίτα του συγκεκριμένου είδους. Πιο συγκεκριμένα τα είδη τα οποία βρίσκονται στο περιβάλλον ανάπτυξης της ιριδίζουσας πέστροφας είναι διάφορα είδη καρκινοειδών, νεαρά ιχθύδια και ποικιλία εντόμων και νυμφών.

Έχοντας ως βάση τα συγκεκριμένα είδη τα οποία παρέχουν στο είδος τις απαιτούμενες απαιτήσεις σε ενέργεια οι υδατοκαλλιέργειες αναζητούν ζωοτροφές οι οποίες θα μπορούν σε καθημερινή βάση να τις ικανοποιήσουν. Με την πάροδο των χρόνων οι πιο διευρυμένες ζωοτροφές που παρέχονται είναι σιτηρέσια υπό την μορφή συμπύκτων. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ισορροπημένης τροφής στο εμπόριο σε διάφορο μέγεθος ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του είδους. Τελευταία οι ζωοτροφές έχουν διαφοροποιήσει την σύνθεση τους για τις διάφορες ανάγκες χρησιμοποιώντας ως βάση όχι μόνο ιχθυάλευρα αλλά και φυτικής προέλευσης προϊόντα όπως το αλεύρι από σόγια(Φώτης,2003).

1.2.Ο γαστρεντερικός σωλήνας των ψαριών

1.2.1 Εισαγωγή

Λεπτομερείς περιγραφές της ανατομίας και της φυσιολογίας του γαστρεντερικού σωλήνα των ψαριών έχουν καλυφθεί σε πληθώρα αναφορών(Ray & Ringo,2014). Τα ψάρια έχουν την δυνατότητα να προσαρμόσουν τα χαρακτηριστικά του γαστρεντερικού τους σωλήνα πολύ γρήγορα ανάλογα με τις λειτουργικές τους ανάγκες σε όλη την διάρκεια της ζωής τους. Η μεγάλη ποικιλομορφία και τα επίπεδα ορμονών καθώς και τα ενδοκρινή κύτταρα του παγκρέατος επιτρέπουν στο ψάρι να αλλάζει γρήγορα τα χαρακτηριστικά στον γαστρεντερικό σωλήνα και σε άλλα οργανικά συστήματα με σκοπό την προσαρμογή τους στην αλλαγή των περιεχόμενων του σωλήνα (διάφορα θρεπτικά,pH,κλπ.).

Το βασικό χαρακτηριστικό της πεπτικής οδού είναι η ικανότητά της να πέπτει και να αφομοιώνει τα θρεπτικά συστατικά των τροφίμων μέσω διαφόρων μηχανισμών μεταφοράς, στα διαμερίσματα τοιχώματος των διαφόρων τμημάτων γαστρεντερικού του σωλήνα.

Η ανατομία και η φυσιολογία του γαστρεντερικού σωλήνα είναι σημαντικοί καθοριστικοί παράγοντες για τη δημιουργία της μικροβιακής κοινότητας. Τα μικρόβια που ευδοκιμούν στο έντερο είναι επίσης πιθανόν να συνδέονται αναπόφευκτα με την πέψη και με την παραγωγή των εξωγενών ενζύμων και βιταμινών που παρασκευάζονται (Ray & Ringo, 2014).

Το πεπτικό σύστημα των σαρκοφάγων ιχθύων αποτελείται από:

- Το στόμα, με τη βοήθεια του οποίου λαμβάνεται η τροφή και το νερό από τον ιχθύ.
- Το σχήμα και το μέγεθος του στόματος κάθε ιχθύος καθώς και η μορφολογία των χειλίων ποικίλλουν κυρίως ανάλογα με τον διατροφικό τους τύπο και την ηθολογία της διατροφής τους.
- Τον οισοφάγο, που ο ρόλος του δεν είναι εμφανής. Πρόκειται για ένα ευδιάκριτο όργανο λόγω των μυών του και είναι πλήρως ή εν μέρει ραβδοειδής και συσπάται εθελούσια. Σε πολλούς ιχθύς η διάκριση του οισοφάγου από τον φάρυγγα και τον στομάχο είναι δύσκολη, εξαιτίας κυρίως του σχετικά μικρού του μήκους, όχι όμως και στη τσιπούρα.
- Τον στομάχο, ο οποίος δεν υπάρχει στο λαρβικό στάδιο και εμφανίζεται στο χρονικό διάστημα της μεταμόρφωσης ή μερικές φορές και αργότερα. Σε πολλά είδη το στομάχι είναι απλώς ένας μακρύς σωλήνας, αλλά στα περισσότερα σαρκοφάγα είδη με μεικτή δίαιτα από ψάρια, καρκινοειδή και σκώληκες, το στομάχι έχει τη μορφή σάκου.
- Τον πυλωρό, που ταυτίζεται με το τέλος του στομάχου. Ελέγχει τη διέλευση της επεξεργασμένης τροφής από τον στομάχο στο λεπτό έντερο και αποτρέπει την παλινδρόμηση της από το λεπτό έντερο στον στομάχο.
- Τα πυλωρικά τυφλά, είναι αποφύσεις του λεπτού εντέρου, που αυξάνουν την επιφάνεια απορρόφησης
- Το έντερο (πρόσθιο, κεντρικό, ακραίο και τελικό τμήμα), όπου ολοκληρώνεται η πέψη και απορρόφηση των τροφών

- Το ήπαρ, είναι ένας μεγάλος αδένας που σε ορισμένα είδη μπορεί να φτάσει το 20% του σωματικού του βάρους και βρίσκεται είτε πάνω είτε γύρω από ο στομάχι. Η λειτουργικότητα του περιλαμβάνει την έκκριση της χολής, την αποθήκευση του γλυκογόνου και άλλες βιοχημικές λειτουργίες
- Την έδρα, που αποτελεί την κατάληξη του πεπτικού σωλήνα των ιχθύων (Νεοφύτου, 1997: Παπουτσόγλου, 2008).

1.2.2 Ανατομία του γαστρεντερικού σωλήνα

Η δομή και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του γαστρεντερικού σωλήνα ποικίλουν ανάμεσα στα είδη και φαίνεται να ταιριάζουν σε μια μεγάλη ποικιλομορφία τροφικών συνηθειών και περιβαλλοντικών συνθηκών. Η δομή που πεπτικού σωλήνα επίσης διαφέρει σε κάθε είδος ψαριού και γενικά προσαρμόζεται ανάλογα με την τροφή και την τροφική συνήθεια του κάθε ψαριού. Όσον αφορά την τροφική συνήθεια, τα είδη χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες. Σαρκοφάγα, φυτοφάγα, παμφάγα, και θριματοφάγα. Η ιριδίζουσα πέστροφα είναι είδος σαρκοφάγο που στο φυσικό της περιβάλλον τρέφεται με μικρά καρκινοειδή, έντομα καθώς και με νεαρά ιχθύδια. Χαρακτηριστικό της είναι ότι κυνηγάει πάντα την τροφή της (Φώτης, 2003). Η διαφορά γίνεται προφανής όταν γίνει σύγκριση των χαρακτηριστικών των γαστρεντερικών σωλήνων αυτών που είναι σαρκοφάγων σε σχέση με αυτών που είναι φυτοφάγων καθώς και επίσης αυτών που ευδοκιμούν στα γλυκά νερά σε σχέση με αυτών που ζουν στα αλμυρά. Οι βλεννογόνοι υμένες, καλύπτουν τα ανοίγματα και τις εσωτερικές διόδους του σώματος, όπως το στόμα, τη μύτη, όπως επίσης και την πεπτική, αναπνευστική και γεννητική οδό. Οι βλεννογόνοι υμένες είναι αποτελεσματικά εμπόδια κατά των μικροοργανισμών που είναι δυνατόν να εισβάλλουν στο σώμα και σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα όργανα παρέχουν τις λειτουργίες της πέψης, οσμορύθμισης, ανοσίας, ενδοκρινής ρύθμισης της γαστρεντερικής οδού και συστημικών λειτουργιών, και την εξάλειψη της περιβαλλοντικής μόλυνσης και τοξικών μεταβολίτων.

1.2.3 Στομάχι & πρόσθιο έντερο

Υπάρχουν δυο βασικές ομάδες ψαριών που συνήθως διακρίνονται στην βάση της ύπαρξης ή όχι του στομάχου. Το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό του πεπτικού συστήματος πολλών φυτοφάγων ψαριών που ανήκουν στις οικογένειες των Cyprinidae, Labridae, Scaridae κλπ είναι η έλλειψη του πραγματικού στομάχου. Στα κυπρινοειδή το εμπρόσθιο τμήμα του εντέρου πρήζεται για να δημιουργήσει μια δομή

σάκου το οποίο ονομάζεται ψευδογάστριο. Όταν υπάρχει έλλειψη στομάχου το πρόσθιο έντερο λειτουργεί ως προσωρινός χώρος αποθήκευσης της καταναλωθείσας τροφής, ενώ το πρόσθιο έντερο εκκρίνει ένα είδος βλέννας η οποία ιστολογικά μοιάζει πάρα πολύ με εκείνη του εντέρου. Η απουσία του στομάχου στα ψάρια αντισταθμίζεται με την παρουσία φαρυγγικών δοντιών ή με την παρουσία στομάχων για άλεσμα της τροφής. Πολλές υποθέσεις έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την απουσία του στομάχου που πολλές φορές είναι αντιφατική και κερδοσκοπική. Το σχήμα, το μέγεθος και η δομή του στομάχου, όταν υπάρχει, συνδέεται άμεσα με την διάρκεια των γευμάτων και την φύση της διαίτας που ακολουθεί κάθε είδος ψαριού (Ray & Ringo, 2014). Τα στομάχια των ψαριών χωρίζονται σε πέντε κατηγορίες βάσει της μορφολογίας τους σε:

- A) ευθύ σωλήνα
- B) Σε σχήμα U (σαλμονοειδή)
- Γ) Σε σχήμα V (Σαλμονοειδή, Σπαριδοειδή)
- Δ) Σε σχήμα Y
- E) Σε σχήμα I

Το στομάχι και το πρόσθιο έντερο της ιριδιζουσας πέστροφας θεωρείται διεσταλμένο σχήματος U και βρίσκεται μεταξύ του οισοφάγου και του εντέρου.

1.2.4 Έντερο

Στα ψάρια το έντερο είναι το κύριο όργανο για την πέψη. Επιπρόσθετα, για τη πέψη και την απορρόφηση της τροφής, το έντερο είναι κρίσιμο για την ισορροπία του νερού και των ηλεκτρολυτών, για την ενδοκρινή ρύθμιση της πέψης και του μεταβολισμού καθώς και για την ανοσία. Το έντερο παρουσιάζει ποικιλία στο μήκος και στην διάταξη του στα διάφορα είδη. Σε μερικά είδη ψαριών το μήκος του εντέρου τους είναι περίπου όσο και το ολικό τους μήκος, ενώ σε μερικά άλλα το μήκος του εντέρου μπορεί να είναι 10 ή 20 φορές μεγαλύτερο του σώματος τους. Αυτό το φαινόμενο παρουσιάζεται στα φυτοφάγα ψάρια ενώ τα σαρκοφάγα ψάρια διακρίνονται σε σχετικά πιο μικρά μήκη εντέρου. Υποτίθεται ότι το μακρύ μήκος του εντέρου των φυτοφάγων σε σύγκριση με των σαρκοφάγων οφείλεται στην απαίτηση για πέψη και απορρόφηση του τμήματος των φυτών που κανονικά καταναλώνουν στο

στάδιο που είναι ενήλικο. Το μεγαλύτερο μήκος και η μάζα του εντέρου των φυτοφάγων σε σχέση με τα σαρκοφάγα επίσης πιστεύεται ότι επιτρέπει την επεξεργασία των σχετικά δύσκολων αντικειμένων. Ωστόσο, είναι επίσης δυνατόν οι φυτικές ίνες που καταναλώνονται από τα φυτοφάγα ψάρια να εξαρτώνται από την επέκταση του εντέρου προκειμένου να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα χρησιμοποίησης. Αντίθετα, μία παλαιότερη έρευνα αποφάνθηκε να δείξει ότι δεν υπάρχουν σαφείς σχέσεις μεταξύ της μορφολογίας των εντέρων και το είδος τροφής, και δεν είναι δυνατό να συναχθούν συμπεράσματα από αυτή την άποψη (Ray & Ringo, 2014).

1.2.5 Ιοι

Το πεπτικό σύστημα των ψαριών είναι επίσης ένα περιβάλλον που διατίθενται για βακτηριοφάγους και για μικροβιακή σύνθεση, ιδιαίτερα για τα βακτήρια, τα οποία μπορούν να επηρεάζονται από την επίδραση των βακτηριοφάγων. Ο αριθμός των ελεύθερων σωματιδίων βακτηριοφάγων στα παράκτια θαλασσινά νερά μπορεί να υπερβαίνει τα 10^8 σωματίδια ανά ml και η βακτηριακή θνησιμότητα λόγω ιογενούς λύσης έχει υπολογιστεί 30% έως 60%. Οι βακτηριοφάγοι έχουν περιγραφεί στην πλειονότητα των βακτηριακών γενών, μεταξύ των οποίων είναι διάφορα παθογόνα βακτήρια όπως *Vibrio spp.* Και το *Aeromonas salmonicida* (Romero et al. 2014).

1.2.6 Θρέψη

Για τους μικροοργανισμούς που έχουν βρεθεί στον πεπτικό σωλήνα υπήρχε πάντα το ερώτημα αν είναι μόνιμα εκεί ή προέρχονται και μεταβάλλονται ανάλογα με την διαθέσιμη τροφή και τις κατάλληλες συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο διαβιούν και αναπτύσσονται. Ένας τρόπος για να γίνει διαχωρισμός είναι μέσω των περιττωμάτων εάν λάβουμε υπόψη μας ότι οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στον πεπτικό σωλήνα λόγω της τροφής αποβάλλονται μέσω αυτών. Βέβαια το παραπάνω δεν αποκλείει την εγκατάσταση κάποιων βακτηρίων που συναντώνται σε τροφές να μην βρίσκονται μέσα στον πεπτικό σωλήνα για κάποιο χρονικό διάστημα.

Κάποιες μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν δείξει ότι η παρουσία βακτηρίων στο έντερο δεκαπόδων είναι διαδεδομένη ανάμεσα σε διαφορετικές ταξινομικές ομάδες και διαφορετικά οικοσυστήματα. Σε διάφορες ομάδες θαλάσσιων ασπόνδυλων οι μικροοργανισμοί προσφέρουν στον ξενιστή ένζυμα που παράγονται

μέσω των βακτηρίων της τροφής έτσι ώστε να γίνει διάσπαση της κυτταρίνης και άλλων σύνθετων πολυσακχαριτών.

Έχει παρατηρηθεί πάντως ότι η ποικιλία των μικροοργανισμών σε κάθε πεπτικό σωλήνα θαλάσσιου ζώου διαφέρει λόγω των διατροφικών τους συνηθειών επιλέγοντας για παράδειγμα πρωτεϊνολυτικά βακτήρια σε περίπτωση σαρκοφάγων ζώων ή κυτταρινολυτικά σε περίπτωση φυτοφάγων (Κορμάς & Μεζίτη, 2011). Δυσνητικά οποιαδήποτε αλλαγή στην τροφή θα μπορούσε να αλλάξει την βιοποικιλότητα των μικροοργανισμών εντός του εντέρου το οποίο μπορεί να προκαλέσει διαταραχή της υγείας και για αυτό το λόγο πολλές φορές χρησιμοποιούνται και προβιοτικά μέσα στις τροφές (Romero et al. 2014).

Παλαιότερα, η έρευνα της γαστρεντερικής μικροοργανισμικής ποικιλότητας είχε στηριχτεί στη χρήση των καλλιεργητικών μεθόδων, των ενζυμικών ελέγχων και του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Στην δεκαετία του 1990 ξεκίνησε η χρήση των μοριακών τεχνικών, για ανίχνευση των μικροοργανισμών και από τότε εδραιώθηκαν σαν μέθοδοι μέχρι και σήμερα (Κορμάς & Μεζίτη, 2011).

1.2.7 Προβιοτικοί οργανισμοί

Ο πεπτικός σωλήνας των ζώων όπως και του ανθρώπου είναι ένα σύστημα πολύπλοκο και μέσα σε αυτόν υπάρχει υπεράριθμος πληθυσμός μικροοργανισμών ο οποίος έρχεται σε επαφή συνεχώς με άλλους μικροοργανισμούς ενδογενούς ή εξωγενούς προέλευσης. Γνωστά είδη είναι μόνο 500 που βρίσκονται στον πεπτικό σωλήνα του ανθρώπου των οποίων η δράση έχουν μεγάλο όφελος για την σωστή λειτουργία της κοινότητας των μικροοργανισμών του πεπτικού μας σωλήνα. Αυτού του είδους οι οργανισμοί ονομάζονται και προβιοτικοί όταν μας προσδίδουν σημαντικά οφέλη στην υγεία μας. Εκτός αυτού οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να βελτιώσουν την αύξηση και την απόδοση των εκτρεφόμενων ζώων. Βασική προϋπόθεση βέβαια είναι να μην είναι παθογόνοι, μη τοξικοί και να μπορούν να είναι μεταβολικώς ενεργοί μέσα στον πεπτικό σωλήνα (Κορμάς & Μεζίτη, 2011).

1.2.8 Σκοπός

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της ποικιλότητας και της αφθονίας των βακτηρίων που υπάρχουν στο γαστρεντερικό σύστημα ατόμων ιριδίζουσας πέστροφας πριν και μετά από ένα γεύμα., με σκοπό την σύγκριση τους

για τη διεύρυνση των γνώσεων μας που αφορούν τις μεταβολές του μικροβιώματος του πεπτικού σωλήνα εξαιτίας της τροφής μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πείραμα εκτροφής και η συλλογή των ατόμων πέστροφας έγινε στο Πανεπιστήμιο του Aberdeen στην Σκωτία όπου πραγματοποιήθηκε και η συλλογή των δειγμάτων εντέρου. Πριν τη δειγματοληψία, τα δείγματα αφέθηκαν ατάιστα για 24 ώρες, ενώ η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε δύο χρονικά διαστήματα: αμέσως μετά το τάισμα ($H=0$) και τρεις ώρες μετά το τάισμα ($H=3$). Τα δείγματα κατά το χρονικό διάστημα $H=0$ χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (control). Μετά τη δειγματοληψία οι γαστρεντερικοί σωλήνες αποθηκεύτηκαν προσωρινά στους -80°C και στη συνέχεια στάλθηκαν σε ειδική συσκευασία με ξηρό πάγο στο Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βόλο, για να πραγματοποιηθεί η απομόνωση του μικροβιακού DNA από τους ιστούς. Η απομόνωση του μικροβιακού DNA από τα 22 δείγματα εντέρου πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit απομόνωσης PowerSoil DNA Isolation Kit (MO Bio Laboratories, Inc.). Συγκεκριμένα, σε ειδικά διαμορφωμένους σωλήνες χωρητικότητας 750μl (Bead tubes) προστέθηκαν 0.25 γραμμάρια δείγματος και 60μl μείγματος C1 που υπήρχε έτοιμο από τον εργαστηριακό εξοπλισμό του Power Soil DNA Isolation Kit. Μετά την ανάδευση του μείγματος έγινε μετακίνηση αυτού σε καινούργιο σωλήνα (Eppendorf tube) χωρητικότητας 2ml. Έπειτα έγινε προσθήκη μείγματος C2 250μl και επώαση στους 4°C για 5 λεπτά, ακολούθησε φυγοκέντρηση του δείγματος για ένα λεπτό σε θερμοκρασίες δωματίου και μετακίνηση του περιεχομένου σε καθαρό σωλήνα των 2ml. Πραγματοποιήθηκε ξανά ίδια διαδικασία προσθέτοντας αυτή τη φορά στο ήδη υπάρχον μείγμα 200μl μείγματος C3 και μετά την επώαση και φυγοκέντρηση προστέθηκαν 1200μl μείγματος C4 για καλύτερη ομογενοποίηση.

Σε σωλήνες τύπου spin filter έγινε προσθήκη 675μl από το παραπάνω μείγμα και ακολούθησε φυγοκέντρηση για περίπου ένα λεπτό. Απορρίπτοντας το διηθημένο ρευστό ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία για τρεις φορές για κάθε δείγμα βάση του πρωτοκόλλου. Έπειτα, προστέθηκαν 1500μl μείγματος C5 και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση απορρίπτοντας ξανά το διηθημένο. Εφόσον έγινε μετακίνηση του spin filter κάθε δείγματος σε καθαρό σωλήνα των 2ml προστέθηκαν

100μl μείγματος C6 και μετά από φυγοκέντρηση το DNA που είχε δεσμευθεί στο spin filter ελευθερώθηκε με τη βοήθεια του C6 κατά τη φυγοκέντρηση στον καθαρό σωλήνα και ήταν έτοιμο για περαιτέρω ανάλυση.

2.1 Στατιστική Επεξεργασία

Η ανάλυση παραλλακτικότητας ενός παράγοντα (one way ANOVA), έγινε μέσω του προγράμματος Past.exe (Hammer, 2001) και χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθούν οι μετρούμενοι παράμετροι μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων, σε κάθε ώρα (H=0 & H=3) ενώ επίσης χρησιμοποιήθηκε και το Ttest βγάζοντας μέσο όρο σε κάθε ώρα δειγματοληψίας για να γίνει επαλήθευση της παραλλακτικότητας ενός παράγοντα. Τα αποτελέσματα θεωρούνταν στατιστικά σημαντικά στο επίπεδο $P < 0.05$.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά την ανάλυση των δεδομένων προέκυψαν οι ακόλουθες παρατηρήσεις. Αρχικά, τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, οδηγούν στο συμπέρασμα πως στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0.05$) δεν παρατηρούνται ανάμεσα στις επαναλήψεις ανά ώρα. Αναλυτικά ο Πίνακας 1 απεικονίζει τους μέσους όρους των OTUs για την ώρα που πήραμε δείγμα πριν δοθεί το γεύμα ($H=0$) και μετά από τρεις ώρες αφότου είχε δοθεί το γεύμα ($H=3$). Σε κάθε ώρα που πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία έγιναν τρεις επαναλήψεις στην πυροαλληλούχιση.

Παρατηρήθηκε η ύπαρξη ειδών μικροοργανισμών οι οποίοι κυριαρχούσαν αριθμητικά έναντι των υπολοίπων. Επιπλέον, τα κυρίαρχα είδη μικροοργανισμών διαφοροποιούνταν ανά επαναληψιμότητα και ανά ώρα δειγματοληψίας. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν τα πέντε είδη μικροοργανισμών με την υψηλότερη αφθονία σε κάθε διαφορετική ώρα ξεχωριστά στις διαφορετικές επαναληψιμότητες. Τα κυρίαρχα είδη μικροοργανισμών διέφεραν ανάμεσα στις επαναλήψεις, αλλά και ανάμεσα στις ώρες δειγματοληψίας. Τα πέντε είδη μικροοργανισμών που βρίσκονταν στην υψηλότερη αφθονία, όταν λαμβάνονταν υπόψη το σύνολο των δειγμάτων από όλες τις δεξαμενές, ήταν οι Otu0001, Otu0003, Otu0015, Otu0014 και Otu0012. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των πέντε ειδών μικροοργανισμών που βρίσκονταν σε υψηλότερη αφθονία καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος.

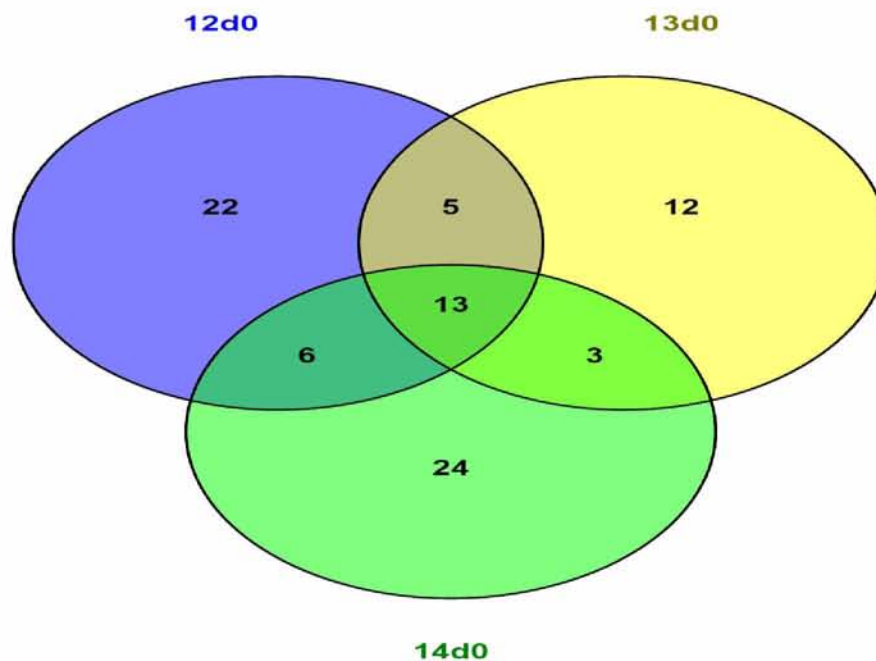
Πίνακας 1. Μέσος όρος αφθονίας των βακτηρίων που βρέθηκαν στο έντερο των δειγμάτων έπειτα από μηδέν και τρεις ώρες μετά το γεύμα.

OTUs	H=0	H=3	OTUs	H=0	H=3	OTUs	H=0	H=3
Otu0001	325	1204	Otu0066	18	0,00	Otu0219	1	0,00
Otu0002	12	3	Otu0067	1	0,00	Otu0224	0,33	0,00
Otu0003	887	411	Otu0068	5	0,00	Otu0225	2	1
Otu0004	1	2	Otu0069	4	2	Otu0242	0,00	2
Otu0005	8	0,00	Otu0072	3	4	Otu0245	3	0,00
Otu0006	0,00	1	Otu0074	0,00	2	Otu0291	1	0,00
Otu0010	0,00	1	Otu0078	1	1	Otu0298	0,00	3
Otu0012	41	12	Otu0081	0,33	0,3	Otu0319	1	0,00
Otu0013	17	0,3	Otu0082	6	0,00	Otu0321	2	0,00
Otu0014	73	30	Otu0084	5	0,00	Otu0322	1	0,00
Otu0015	85	19	Otu0087	5	3	Otu0324	1	0,00
Otu0016	11	2	Otu0094	0,33	0,00	Otu0330	0,33	0,00
Otu0017	3	1	Otu0100	4	5	Otu0334	0,00	0,3
Otu0018	31	9	Otu0105	0,33	0,00	Otu0340	2	0,00
Otu0019	13	14	Otu0108	0,00	2	Otu0344	1	0,00
Otu0020	1	0,00	Otu0109	0,00	1	Otu0353	0,00	2
Otu0021	4	0,00	Otu0110	0,00	1	Otu0358	1	0,00
Otu0022	0,33	0,00	Otu0114	0,00	2	Otu0379	1	0,00
Otu0023	3	0,00	Otu0116	1	1	Otu0391	1	0,00
Otu0024	1	2	Otu0119	0,33	0,00	Otu0406	1	0,00
Otu0025	9	6	Otu0123	1	0,00	Otu0413	1	0,00
Otu0027	13	3	Otu0127	0,33	0,00	Otu0456	0,33	0,00
Otu0029	0,00	1	Otu0137	0,00	0,3	Otu0475	1	0,00
Otu0030	1	11	Otu0140	10	0,00	Otu0479	1	0,00
Otu0031	7	2	Otu0142	1	0,00	Otu0480	1	0,00
Otu0033	6	3	Otu0143	0,33	0,00	Otu0506	0,33	0,00
Otu0034	9	0,00	Otu0149	0,33	0,00	Otu0519	0,33	0,00
Otu0035	9	0,00	Otu0154	0,00	1	Otu0688	0,33	0,00
Otu0038	5	1	Otu0155	4	0,00	Otu0697	0,00	1
Otu0039	7	1	Otu0163	1	0,00			
Otu0047	4	1	Otu0172	4	0,00			
Otu0048	10	0,00	Otu0190	4	0,00			
Otu0050	21	9	Otu0205	1	0,00			
Otu0051	30	0,00	Otu0207	3	0,00			
Otu0056	0,33	9	Otu0208	5	0,00			
Otu0058	1	2	Otu0212	0,00	3			
Otu0059	5	0,00	Otu0213	0,33	2			
Otu0063	32	0,00	Otu0217	0,33	0,00			

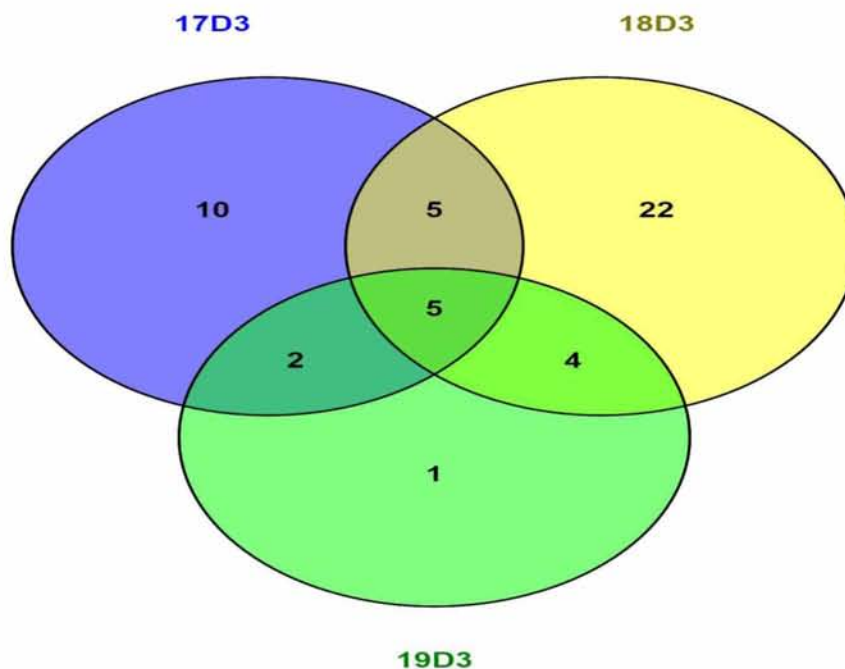
Πίνακας 2. Μέσος όρος κυρίαρχων ειδών των μικροοργανισμών σε ποσοστό %.

OTUs	H=0	H=3
Otu0001	18,11	66,96
Otu0003	49,39	22,85
Otu0015	4,71	1,08
Otu0014	4,05	1,65
Otu0012	2,28	0,67

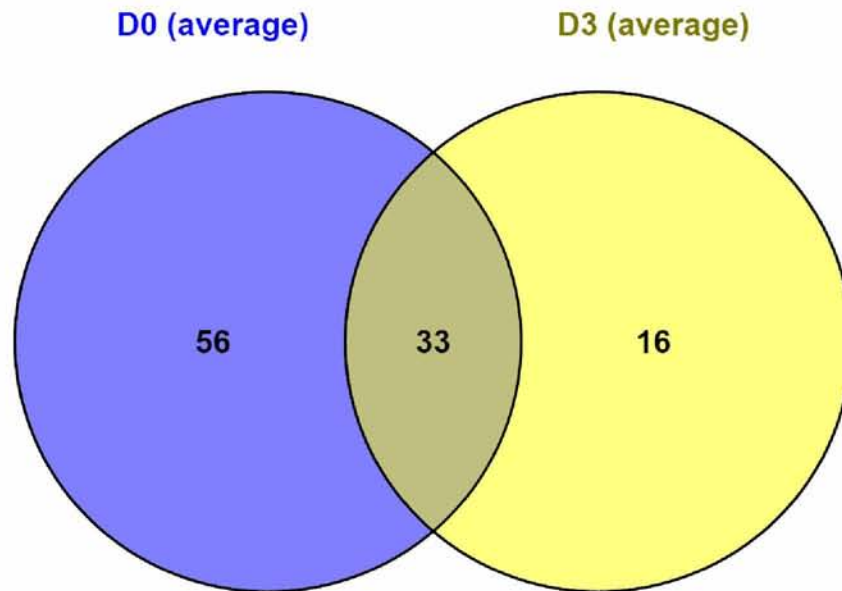
Αν και στατιστικά δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές σε κάθε επαναληψιμότητα, οι αφθονίες των βακτηρίων που βρέθηκαν και για τις δύο διαφορετικές ώρες, δεν ήταν οι ίδιες. Βάση των παραπάνω, σχεδιάζοντας δύο διαγράμματα Venn (για κάθε ώρα ξεχωριστά) όπως φαίνεται στα Σχήματα 1,2 μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι στην ώρα μηδέν (H=0) μόνο 13 είναι κοινά σε κάθε επανάληψη ενώ μετά από τρεις ώρες (H=3) μόνο 5 OTUs βρέθηκαν κοινά σε κάθε επαναληψιμότητα. Βγάζοντας έναν μέσο όρο από τις τρεις επαναληψιμότητες σε κάθε ώρα που έγινε δειγματοληψία παρατηρείται ότι 33 είδη είναι κοινά και υπάρχουν πριν και μετά το γεύμα (Σχ. 3).



Σχήμα 1. Διάγραμμα Venn στο οποίο παρουσιάζεται ο αριθμός ειδών που απαντώνται αποκλειστικά στην 1^η επαναληψιμότητα, των ειδών που απαντώνται αποκλειστικά στην 2^η και στην 3^η καθώς και των ειδών που απαντώνται σε όλες για $H=0$.



Σχήμα 2. Διάγραμμα Venn στο οποίο παρουσιάζεται ο αριθμός ειδών που απαντώνται αποκλειστικά στην 1^η επαναληψιμότητα, των ειδών που απαντώνται αποκλειστικά στην 2^η και στην 3^η καθώς και των ειδών που απαντώνται σε όλες για $H=3$



Σχήμα 3. Διάγραμμα Venn στο οποίο παρουσιάζεται ο αριθμός ειδών που απαντώνται αποκλειστικά στην $H=0$ των ειδών που απαντώνται αποκλειστικά στην $H=3$ και των ειδών που απαντώνται και στις διαφορετικές ώρες.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σύνθεση και η δομή των βακτηριακών κοινοτήτων εντός του εντερικού οικοσυστήματος του ψαριού δεν έχει εξερευνηθεί πλήρως παρόλο που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον οργανισμό του, στην υγεία του καθώς και στο ανοσοποιητικό του (Etyemez et al.2015). Ο γαστρεντερικός σωλήνας είναι ένα πολύ περίεργο σύστημα που βοηθάει όχι μόνο την πέψη αλλά και την οσμωρύθμιση. Εκτός των παραπάνω παρέχει αμυντικούς μηχανισμούς απέναντι σε διάφορα παθογόνα που διέρχονται από αυτόν (E. Ringø & Song,2016). Η φυσιολογία των εντέρων στους οστειχθύες διαφέρει σε πολλές απόψεις με αυτών των ομοιόθερων ζώων και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να θεωρείται ότι και τα βακτήρια σε κάθε οργανισμό μπορούν να επηρεάσουν τον αριθμό των κοινοτήτων και την σύνθεση των ειδών (στο έντερο) σε διαφορετικά είδη. Συγκριτικά πάντως στα ψάρια όπως προαναφέραμε δεν έχει γίνει εκτενής διερεύνηση και συνεχώς έχουμε νέες πληροφορίες οι οποίες βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση των ιχθύων (Heikkinen et al.2006).

Κανένας από τους μορφολογικούς παράγοντες δεν έχουν καταφέρει να εξηγήσουν με εξαιρετική ακρίβεια τις εναλλαγές των βακτηριακών κοινοτήτων, πάραυτα ένα χρονικό πρότυπο διακύμανσης έχει παρατηρηθεί. Υπάρχει μια κυρίαρχη υπόθεση ότι οι κοινότητες βακτηρίων και μικροοργανισμών εναλλάσσεται βάση της διαθεσιμότητας της τροφής, η οποία φαίνεται να επηρεάζει τις κοινότητες εντός του εντέρου (Μεζίτη et al.2010). Το ότι η τροφική συνήθεια παίζει σημαντικό ρόλο στην μικροβιακή κοινότητα των ιχθύων έχει υποστηριχθεί και από έρευνες των Ghanbari et al.(2015) & Tzeng et al (2015) οι οποίοι επίσης επισήμαναν ότι η ποικιλία των μικροοργανισμών που συναντούνται στο έντερο ενός σαρκοφάγου διαφέρουν με αυτών ενός φυτοφάγου, με αυτών ενός παμφάγου ή και άλλων ειδών. Ο Wu et al.(2012) σε έρευνα τους αναφέρουν ότι η πολυπλοκότητα των μικροβιακών αυτών κοινοτήτων σε κάθε είδος πιστεύεται ότι παρέχει διάφορα οφέλη και για αυτό έχουν κεντρίσει και το ενδιαφέρον άλλων ερευνητών. Επίσης, το εντερικό μικροβίωμα σε κάθε ζώο είναι τόσο περίπλοκο που δεν είναι δυνατό ακόμα και από μία συγκεκριμένη δίαιτα να βγάλουμε πολύ συγκεκριμένα συμπεράσματα. Αυτό υποστηρίζεται από έρευνα των Desai et al. (2012) η οποία αναφέρει ότι ακόμα και σε ελεγχόμενο περιβάλλον σε ζώα που παρεχόταν συγκεκριμένη δίαιτα παρατηρήθηκαν ορισμένοι διαφορετικοί μικροοργανισμοί σε κάθε ζώο ξεχωριστά.

Η αυτόχθονη μικροχλωρίδα η οποία είναι σε άμεση επαφή με τον ξενιστή αποτελείται από κοινότητες που μπορεί να περιέχουν διάφορους παθογόνους και συμβιωτικούς οργανισμούς που επηρεάζουν το ανοσοποιητικό των ψαριών ενώ μπορούν να δημιουργήσουν και ανοχή σε διάφορες φλεγμονές (Al-Hisnawi et al. 2015). Οι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί είναι κάτω από συνεχή έρευνα καθώς πιστεύεται ότι μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτική λύση για χορήγηση των αντιβιοτικών μέσω της τροφής. Η επίδραση που έχουν στην προστασία των οργανισμών έναντι διάφορων παθογόνων πιστεύεται ότι θα δημιουργήσει ένα καλύτερο ανοσοποιητικό το οποίο θα είναι η πρώτη γραμμή κατά την εισβολή παθογόνων ή διαφόρων αποικιών (E. Ringø & Song, 2016). Αυτή η άποψη υποστηρίζεται από διάφορους ερευνητές οι οποίοι πιστεύουν ότι είναι απαραίτητη η εισαγωγή των συμβιωτικών οργανισμών σε τροφές με σκοπό την χειραγώγηση των μικροοργανισμών οι οποίοι θα έχουν θετικό αποτέλεσμα στην υγεία των ψαριών (Ghanbari et al. 2015) και αυτό γιατί όπως αναφέρεται προηγουμένως η διατροφή είναι ο σημαντικότερος παράγοντας ο οποίος επηρεάζει το μικροβίωμα των ιχθύων. Παρακάτω παρατίθεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας ο οποίος αφορά έρευνες που έχουν γίνει πάνω σε υδρόβιους οργανισμούς για την ανάλυση του μικροβιώματος τους (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Πειράματα που έχουν εκπονηθεί σε υδρόβιους οργανισμούς με σκοπό την ανάλυση του μικροβιώματός τους.

Είδος	Μέθοδος	Αποτελέσματα	Πηγή
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Πέστροφες ταΐστηκαν με συμβατική τροφή και απομονώθηκε το γονιδιακό DNA από το έντερο. Στα 16 δείγματα γίνεται πυροαλληλούχιση των βακτηριακών γονιδίων. Σκοπός της εργασίας είναι η κατανόηση του ρόλου των βακτηριακών κοινοτήτων εντός του εντέρου της εκτρεφόμενης πέστροφας	Παρατηρήθηκε ότι τα κυρίαρχα γένη βακτηρίων ήταν τα <i>Acinetobacter</i> , <i>Cetobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , & <i>Psychrobacter</i> . Σε μικρότερο βαθμό ήταν τα γένη <i>Aeromonas</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Deefgea</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Neptuniibacter</i> , & <i>Mycoplasma</i>	Miray Etyemez , José Luis Balcázar (2015)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Πέστροφες ταΐστηκαν με τροφή βασισμένη σε σογιάλευρο(SBM) και με συμβατική τροφή(FM) για 8(I) & 18(II) εβδομάδες. Πραγματοποιήθηκε ανίχνευση μικροβίων μέσω του βιοχημικού προφίλ & της μέθοδου ενσωμάτωσης μικροοργανισμών σε τριβλίο και χρησιμοποιήθηκε η LH-PCR για την ταξινόμηση βακτηρίων με την υπομονάδα 16S ριβοσωματικού RNA	Τυπικές ιστολογικές μεταβολές παρατηρήθηκαν μετά από 18 εβδομάδες σίτισης με SBM. Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην συμπεριφορά των δειγμάτων, στον χρωματισμό και στην αύξηση του βάρους αν και ο δείκτης μετατρεψιμότητας είναι μεγαλύτερος στην SBM τροφή από ότι στην FM. Σε αμφοτέρες τις ομάδες SBM και FM οι μετρήσεις των καλλιεργήσιμων εντερικών βακτηρίων μειώθηκαν εντός των πρώτων 4 εβδομάδων της σίτισης (I). Στη συνέχεια, οι αριθμοί των βακτηρίων αυξήθηκαν στην ομάδα FM, αλλά όχι στην ομάδα SBM από την 8η εβδομάδα και μετά του πειράματος.	Jouni Heikkinen, Jouni Vielma , Outi Kemiläinen , Marja Tirola , Päivi Eskelinen, Tapio Kiuru , Dina Navia- Paldanius, Atte von Wright(2006)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	108 δείγματα ταΐστηκαν με δυο είδη τροφών. Η μία	Το μικροβιακό προφίλ των δειγμάτων που τράφηκαν με την συμβατική τροφή άλλαξε κατά την	Atul R. Desai, Matthew G. Links, Stephanie

	τροφή ήταν βασισμένη σε φυτικά προϊόντα ενώ η δεύτερη ήταν με βάση το ιχθυάλευρο. Οι μικροοργανισμοί ανιχνεύθηκαν μέσω της πυροαλληλούχισης (Αλληλουχία 16S rRNA γονιδίων Χρήση PCR και κλωνοποίησης)	διάρκεια του πειράματος και παρατηρήθηκε μείωση των ειδών καθώς και την ποικιλομορφίας. Τα δείγματα που τράφηκαν με τροφή βασισμένη σε φυτικά προϊόντα είχαν υψηλότερο ποσοστό βακτηρίων του γένους Firmicutes στο έντερο σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου.	A. Collins, Graeme S. Mansfield, Murray D. Drew, Andrew G. Van Kessel, Janet E. Hill(2006)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ιριδίζουσες πέστροφες τράφηκαν με συμβατική τροφή με βάση το ιχθυάλευρο(FM) & με τροφή η οποία κατά 50% περιείχε σογιάλευρο(SBM) για 16 εβδομάδες.	Στα δείγματα που τράφηκαν με SBM τροφή παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα του εντέρου καθώς και οι μικρολάχνες είχαν υποστεί ζημία που οδηγεί σε πιθανή εντερίτιδα. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε ότι υπάρχουν αυτόχθονες βακτηριακές κοινότητες και στις δύο ομάδες(SBM & FM). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους μικροοργανισμούς μεταξύ των δύο ομάδων.	D.L Merrifield, A Dimitroglou, G. Bradley, R.T.M Baker & S J Davies(2009)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ιριδίζουσες πέστροφες χωριστήκαν σε δυο ομάδες και ταΐστηκαν με δυο διαφορετικές τροφές οι οποίες είχαν ως βάση το σογιάλευρο(SBM) και το ιχθυάλευρο(FM). Συλλέχθηκαν 9 ιστοί από κάθε ομάδα δειγμάτων και έγινε ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με την βοήθεια της cpn60 PCR	Στα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα που τράφηκαν με τροφή που είχε βάση το σογιάλευρο είχαν ως κυρίαρχο είδος το <i>C. Maltaromaticum</i> και παρουσίαζαν μικρότερη ποικιλομορφία σε σχέση με τα δείγματα της άλλης ομάδας. Τα δείγματα της ομάδας που τράφηκαν με τροφή που είχε ως βάση το ιχθυάλευρο βρέθηκαν τα γένη <i>Hafnia</i> , <i>Pseudomonas</i> and <i>Aeromonas</i> σε μεγαλύτερο ποσοστό.	Graeme S. Mansfield, Atul R. Desai, Stephanie A. Nilson, Andrew G. Van Kessel, Murray D. Drew, Janet E. Hill(2010)
<i>Salmo trutta</i>	Από δείγματα καφέ πέστροφας συλλέχθηκαν ιστοί από τα πυλωρικά	Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες των δειγμάτων. Βρέθηκε σε μεγάλο ποσοστό το είδος	Ali Al-Hisnawi, Einar Ringø, Simon J Davies, Paul Waines,

	<p>τυφλά, την πρόσθιο βλεννογόνο & την οπίσθια βλεννογόνο. Το σύνολο του μικροβιώματος(TV C) ταυτοποιήθηκε σε αποικίες σε τριβλία με το άγαρ σόγιας ως υπόστρωμα. χρησιμοποιήθηκε και η PCR-DGGE για να αξιολογήσει όλες τις κοινότητες των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (Lactic acid bacteria,LAB)</p>	<p><i>Carnobacterium maltaromaticum</i>. Πολλά OTUs βρέθηκαν σε όλες τις γαστρεντερικές περιοχές παρόλα αυτά μερικά OTUs έδειξαν να συγκεντρώνονται σε μεμονωμένες περιοχές του γαστρεντερικού σωλήνα.</p>	<p>Graham Bradley & Daniel Lee Merrifield(2015)</p>
<p><i>Nephrops norvegicus</i></p>	<p>Συλλέχθηκαν δείγματα συγκεκριμένους μήνες τους έτους σε κάθε εποχή και απομονώθηκαν τα εντερικά τμήματα αυτών. Έγινε ανίχνευσης της πλειονότητας των μικροοργανισμών μέσω της μελέτης των αλληλουχιών του 16S rRNA γονιδίου και η δομή της βακτηριακής κοινότητας έγινε με την βοήθεια του προγράμματος ARISA.</p>	<p>Το προφίλ ARISA έδειξε μεγάλη μεταβλητότητα στον ιστό των εντέρων των δειγμάτων. Η σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων των εντέρων έδειξε ότι υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα που συλλέχθηκαν και οι κοινότητες των βακτηρίων διαφοροποιούντουσαν αναλόγως την εποχή και τον μήνα συλλογής.</p>	<p>Alexandra Meziti, Alban Ramette, Eleni Mente & Konstantinos Ar. Kormas(2010)</p>
<p><i>Ctenopharyngodon idellus</i></p>	<p>Τα δείγματα που συλλέχθηκαν τυχαία τράφηκαν με συμβατική τροφή που χρησιμοποιείται στην εκτροφή του συγκεκριμένου είδους. Τα ψάρια σιτίζονταν δυο φορές την ημέρα</p>	<p>Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εντερική κοιλότητα του συγκεκριμένου είδους φιλοξενεί πολλές κοινότητες βακτηρίων όπως για παράδειγμα είδη των <i>Anoxybacillus</i>, <i>Leuconostoc</i>, <i>Clostridium</i>, <i>Actinomyces</i>, & <i>Citrobacter</i>.</p>	<p>Shangong Wu, Guitang Wang, Esther R. Angert, Weiwei Wang, Wenxiang Li, Hong Zou(2011)</p>

	και μόλις έγινε η περάτωση της διαδικασίας αυτής απομονώθηκαν οι εντερικές περιοχές των δειγμάτων για να γίνει η εξαγωγή του DNA. Έπειτα για την αναγνώριση των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν οι PCR- DGGE & T-RFLP αναλύσεις		
<i>Macrobrachium nipponense</i>	Επιλέχθηκαν δείγματα από λίμνες και ποτάμια του συγκεκριμένου είδους και όλα ήταν γένος αρσενικού. Χρησιμοποιήθηκε και ένα κοντινό είδος γαρίδας το οποίο μοιάζει πολύ στο δείγμα για να γίνει σύγκριση. Αφαιρέθηκαν τα εντόσθια στα οποία έγινε και μικροβιολογική ανάλυση με την βοήθεια της πυροαλληλούχισης.	Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κυρίαρχα γένη είναι τα Proteobacteria & ακολουθούν τα Firmicutes & Actinobacteria. Η σύγκριση των δυο ειδών δεν έδειξε τόσο μεγάλη διαφορά στις μικροβιακές κοινότητες όσο έδειξε η σύγκριση των ποταμίσσιων ειδών με των λιμναίων.	Tzong-Der Tzeng, Yueh-Yang Pao, Po-Cheng Chen, Francis Cheng-Hsuan Weng, Wen Dar Jean, Daryi Wang(2015)
<i>Salmo salar</i>	Τα ψάρια σιτίστηκαν με δυο διαφορετικές τροφές. Η μία ήταν βασισμένη στο ιχθυάλευρο(FM)& η άλλη σε σογιάλευρο(SBM). Μετά το τέλος της σίτισης και έπειτα από 4-6 ώρες συλλέχθηκαν 5 άτομα από κάθε ομάδα στα οποία συλλέχθηκαν τα έντερα τους για	Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το έντερο του σολομού κυριαρχείται από <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Lactococcus sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> και <i>Vibrio sp.</i> Η Μοριακή ανάλυση δειγμάτων από την άμεση εκχύλιση DNA επέτρεψε την ανίχνευση βακτηρίων γαλακτικού οξέος. Πριν από την καλλιέργεια ανιχνεύθηκαν <i>Vibrio sp.</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> και <i>Pseudomonas sp.</i> , που δεν είχαν εντοπιστεί από τις άμεσες αναλύσεις.	Maria Befring Hovda, Bjørn Tore Lunestad, Ramon Fontanillas, Jan Thomas Rosnes(2007)

	περαιτέρω ανάλυση με την βοήθεια της PCR & DGGE ανάλυσης και με την με την υπομονάδα 16S ριβοσωματικού RNA.		
<i>Sparus aurata</i>	Άτομα τσιπούρας συλλέχθηκαν και σιτιστήκαν με δυο είδη συμβατικών τροφών για 12 μήνες. Η μία τροφή ήταν συμβατική ενώ η δεύτερη ήταν βιολογική. Η Ταξινόμηση των βακτηρίων έγινε με την υπομονάδα 16S ριβοσωματικού RNA. Συγκρίσεις έγιναν και με δείγματα εντέρου τσιπούρας από άγριους πληθυσμούς.	Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα περισσότερα βακτήρια ανήκανε στα γένη <i>Proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Actinobacteria</i> , & <i>Bacteroidetes</i> . Ο αριθμός των OTUs ήταν σημαντικά μειωμένος στα άτομα τσιπούρας που τράφηκαν με βιολογική τροφή σε σχέση με αυτά που τράφηκαν με την συμβατική. Το κυρίαρχο είδος βακτηρίου σε όλα τα άτομα που εξετάστηκαν ήταν του γένους <i>Diaphorobacter</i> . Ακόμα περισσότερο μειωμένη ήταν η ποικιλομορφία στα άγρια άτομα. Πιο συγκεκριμένα 17 OTUs ήταν κοινά σε όλα τα δείγματα. 12 OTUs ήταν κοινά ανάμεσα στα άτομα τα οποία σιτίστηκαν με τις δύο διαφορετικές τροφές και μόνο 5 ήταν κοινά ανάμεσα στα άγρια άτομα τσιπούρας και στα άτομα που τράφηκαν με συμβατική τροφή.	Konstantinos A. Kormas, Alexandra Meziti, Eleni Mente & Athanasios Frentzos(2014)
<i>Lates calcarifer</i>	Τα δείγματα τράφηκαν είτε μια δίαιτα βασισμένη στο ιχθυάλευρο, ή μια δίαιτα που βασίζεται σε ένα συνδυασμό ζωικών και φυτικών πρωτεϊνών. Η τρίτη διατροφή ήταν παρόμοια με την 2η με την εξαίρεση ότι το 6% υδρολυμένης γλουτένης σίτου (HWG) συμπεριλήφθηκε σε αντικατάσταση των άλλων πρωτεϊνών.	Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κυρίαρχα είδη ήταν μέλη των γενών <i>Proteobacteria</i> , <i>Cyanobacteria</i> & <i>Firmicutes</i> . Ορισμένες διαφορές στις σχετικές αφθονίες των OTUs υπήρξαν μεταξύ κάθε δίαιτας, ωστόσο, η συνολική κοινότητα δεν έχει τροποποιηθεί σε μεγάλο βαθμό από την δίαιτα HWG.	E. Apper, D. Weissman, F. Respondek, A. Guyonvarch, F. Baron, P. Boisot, A. Rodiles, D.L. Merrifield(2015)

	Μετά 48 ταΐσματος, λήφθηκαν δείγματα εντέρου για ανάλυση του μικροβιώματος. Έγινε Ταξινόμηση βακτηρίων με την υπομονάδα 16S ριβοσωματικού RNA.		
--	--	--	--

Οι Meziti et al.(2012) παρατηρήσανε σε έρευνα πάνω στη διαίτα του είδους *N. Norvegicus* ότι οι μικροοργανισμοί εντός του εντέρου παρουσίασαν διάφορες εναλλαγές στις αλλαγές της εποχής το οποίο συνδέεται με το κατά πόση τροφή είχαν διαθέσιμη τα άτομα σε κάθε εποχή. Οι ίδιοι συγγραφείς το 2010 είχαν αναφέρει σε παρεμφερή έρευνα που είχαν πραγματοποιήσει στην καραβίδα, το διάστημα Αυγούστου-Δεκεμβρίου, όπου η τροφή σπανίζει, ότι οι βακτηριακές κοινότητες στα άτομα καραβίδας δεν είχαν μεγάλες διαφορές. Το διάστημα Φεβρουαρίου-Αυγούστου οι κοινότητες βακτηρίων σιγά-σιγά άρχισαν να διαφοροποιούνται μεταξύ τους.

Σε πειράματα πάνω στην ιριδίζουσα πέστροφα παρατηρήθηκε ότι υπήρξε διακύμανση των μικροοργανισμών στο έντερο τους όταν τους παρέχονταν η ίδια διαίτα. Αυτό ίσως περιπλέκει τις επιπτώσεις που έχουν οι ζωοτροφές στο ψάρι καθώς αντικρούει την υπόθεση της σχέσης της διατροφής με τους μικροοργανισμούς (Mansfield et al.2010). Οι Gatesoupe et al. (2014) παρατήρησαν ότι στο λαβράκι τα βακτήρια είχαν επηρεαστεί από την διαίτα την οποία ακολουθούσε και βρέθηκε ότι το είδος *Vibrio* sp ήταν το κυρίαρχο είδος.

Σε διαφορετικές έρευνες πάνω πάλι στην ιριδίζουσα πέστροφα απομονώθηκαν τέσσερα κυρίαρχα είδη τα οποία αποτελούσαν τον πυρήνα των μικροοργανισμών στο έντερο (*Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*). Αυτά τα είδη πιστεύεται ότι βρίσκονται στο έντερο ανεξάρτητα από το τι είδους διαίτα ακολουθεί η ιριδίζουσα πέστροφα (Ghanbari et al.2015, Al-Hisnawi et al.2015). Οι Heikkinen et al. (2006), που διερεύνησαν δύο διαφορετικές τροφές όπου, η μια στηρίζονταν στο ιχθυάλευρο και η άλλη σε εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης στο αλεύρι από σόγια, και παρατήρησαν ότι και στις δύο τροφές τα κυρίαρχα αερόβια είδη ήταν τα *Aeromonas*, *Sphingomonas* & *Chryseomonas* καθώς και τα *Lactococcus* & *Lactobacillus*. Εκτός

αυτού επισημαίνουν ότι δεν υπήρχαν συγκρίσιμες διαφορές ανάμεσα στις δύο διαφορετικές τροφές και δεν απομονώθηκε κάποιο συγκεκριμένο είδος. Σε παρεμφερές πείραμα των Merrieffield et al. (2009) έγινε η ίδια παρατήρηση. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των Ringø et al. (2008) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στα σαλμονοειδή δεν παρατηρούνται αλλαγές και μπορεί η τροφή με βάση το αλεύρι από σόγια να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία εφόσον δεν έχει αρνητικά αποτελέσματα στην φυσιολογία του εντέρου. Στον αντίποδα, στην ίδια εργασία από τους Merrieffield et al (2009) αναφέρεται ότι υπήρξαν έρευνες σε σαλμονοειδή που έδειξαν ότι με την παραπάνω δίαιτα παρατηρήθηκαν αυξήσεις των βιώσιμων μικροβίων στο έντερο αλλά υπήρξε σημαντική μείωση αυτών έπειτα από οκτώ βδομάδες σίτισης. Στην παρούσα έρευνα έπειτα από τρεις ώρες γεύματος στα κυρίαρχα είδη, που αναγράφονται στον πίνακα 2, παρατηρήθηκε περίπου το ίδιο αποτέλεσμα καθώς σημαντική αύξηση είχε μόνο το OTU0001 ενώ τα υπόλοιπα μειώθηκαν σημαντικά. Επίσης αυτό διακρίνεται και στο Σχήμα 3 Venn όπου φαίνεται ότι την ώρα μηδέν υπήρχαν στα δείγματα, κατά μέσο όρο, περισσότερες παρουσίες OTUs σε σχέση μετά το γεύμα.

Οι Etyemez et al. (2015) αναφέρουν στην εργασία τους ότι στις βακτηριακές κοινότητες στο εσωτερικό του εντέρου ιριδίζουσας πέστροφας κυριαρχούσαν τα γένη *Psychobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* & *Cetobacterium* αν και θεωρούν ότι δεν είναι εύκολο να γίνουν συγκρίσεις με άλλες παρεμφερείς εργασίες καθώς υποστηρίζει ότι η συγκρότηση των μικροοργανισμών στο έντερο των ιχθύων μπορεί να επηρεαστεί και από παράγοντες όπως ο περιβάλλον χώρος που αναπτύσσεται το κάθε είδος. Εκτός αυτού αναφέρει ότι τα είδη *Psychobacter* spp. θεωρούνται ως κυρίαρχα σε ψάρια τα οποία ακολουθούν συγκεκριμένη διατροφή σε εντατικές καλλιέργειες. Το παραπάνω έρχεται σε αντίθεση με την εργασία των Hovda et al. (2007) οι οποίοι αναφέρει ότι τέσσερα είδη βακτηρίων ανάμεσα τους και τα *Psychobacter* spp. (τα άλλα τρία είναι τα : *Acinobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp.) δεν μπορούν να θεωρηθούν κυρίαρχα είδη στο έντερο του Σολωμού του Ατλαντικού. Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας αυτά τα βακτήρια μπορούν να κυριαρχήσουν ως βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB). Τα είδη του *Aeromonas* spp. έχουν ανιχνευθεί στην εντερική βλεννογόνο διαφόρων ειδών όπως για παράδειγμα στον Μπακαλιάρο του Ατλαντικού, στον Αρκτοσαλβενίνο κλπ. Οι Wu et al. (2012) αναφέρουν ότι τα βακτήρια τα οποία συνδέονται με την εντερική βλεννογόνο είναι ενδογενή και έχουν

λόγο στη θρέψη του ζενιστή, στην ανοσία του και σε διάφορους άλλους αμυντικούς μηχανισμούς και πιο ειδικά τα είδη του *Aeromonas spp* παίζουν σημαντικό ρόλο στην βιολογία των ιχθύων.

Μία πρόσφατη μελέτη που αφορά την μικροβιακή χλωρίδα των *Danio rerio* σε ελεγχόμενο περιβάλλον και κάτω από συνθήκες σίτισης και πείνας απέδειξε ότι μερικές τάξεις βακτηρίων που βρέθηκαν στην εντερική κοιλότητα του ψαριού υπήρχαν σε ίδιες συχνότητες και στο νερό. Το παραπάνω εύρημα συνιστά ότι το περιβάλλον επηρεάζει πιο εύκολα τα ψάρια από ότι τα ανώτερα θηλαστικά ειδικότερα όταν ο οργανισμός βρίσκεται κάτω από συνθήκες πείνας (Ghanbari et al.2015). Στην περίπτωση της εκτρεφόμενης καραβίδας (*N. norvegicus*) σε πειραματικό στάδιο μελετήθηκαν οι βακτηριακές κοινότητες από διαφορετικές πηγές τροφής. Οι αναλύσεις έδειξαν ότι στο έντερο η βακτηριακή ποικιλομορφία χωρίζεται σε δύο ομάδες με το αν παρέχόταν στο ζώο τροφή ή όχι. Έπειτα από τρεις μήνες σίτισης οι καραβίδες που σιτίστηκαν, από τροφή που είχε βάση το μύδι, είχαν διαφορετική βακτηριακή ποικιλομορφία από ότι είχαν στο ξεκίνημα του πειράματος (Μεζίτη et al.2012).

Μία διαφορετική έρευνα η οποία πραγματοποιήθηκε πάνω σε νεαρά άτομα πολύδοντου (*Polyodon spathala*) & στον μαρμαροκυπρίνο (*Hypophthalmichthys nobilis*) απέδειξε ότι υπήρχαν συγκεκριμένα διαφορετικά είδη στο εσωτερικό του εντέρου κάθε είδους παρόλο που τα ψάρια και των δύο ειδών ήταν στον ίδιο χώρο με το ίδιο πλαγκτόν. Παρόλα αυτά στα νεαρά άτομα του πολύδοντου παρατηρήθηκε μικρότερη ποικιλομορφία μικροβιώματος (Ghanbari et al.2015). Επιπροσθέτως, οι Ghanbari et al.(2015), παρατήρησαν σημαντικές διαφορές στο μικροβίωμα των λιμναίων και βενθικών ενήλικων ατόμων κιχλίδων. Οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν σε μία άλλη εργασία που έγινε ανάμεσα σε τέσσερα διαφορετικά είδη ψαριών (*Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss*, *H.molitrix* & *Dorosoma cepedianum*) ότι κάτω από ίδιες συνθήκες επιβίωσης/εκτροφής/σίτισης, υπήρξαν σημαντικές διαφορές στους μικροοργανισμούς των εντέρων τους.

Οι Apper et al. (2016) ερεύνησαν την χορήγηση σε ζωοτροφή υδρολυμένης γλουτένης σίτου για να δουν τα αποτελέσματα στην ανάπτυξη και στην πέψη των ασιατικών λαβρακιών. Παρατηρήθηκε ότι οι βακτηριακές κοινότητες είχαν υποστεί αλλαγές στον βλεννογόνο χιτώνα κατά την διάρκεια της πέψης. Οι Abid et al. (2013)

σε έρευνα του πάνω στον Σολωμό του ατλαντικού έκαναν δοκιμαστική διατροφή διάρκειας 63 ημερών. Μετά το τέλος του πειράματος παρατήρησαν ότι σε όλο το πεπτικό σύστημα των ψαριών που είχαν ταϊστεί με τροφές που περιείχαν συμβιωτικούς μικροοργανισμούς υπήρξε μεγαλύτερη ποικιλομορφία των βακτηριακών κοινοτήτων σε αντίθεση με αυτών που δεν είχαν ταϊστεί. Η ανάπτυξη των ψαριών δεν επηρεάστηκε και θεωρήθηκε βάση των αποτελεσμάτων ότι οι τροφές οι οποίες περιείχαν με συμβιωτικούς μικροοργανισμούς είχαν θετικό αντίκτυπο στην υγεία των ψαριών καθώς ενίσχυαν το ανοσοποιητικό του σύστημα.

Σε βιβλιογραφική του εργασία το 2015 οι Ringø et al έκαναν αναφορά σε μια πρώιμη μελέτη (1988) και αναφέρουν ότι δυο είδη βακτηρίων (*Aeromonas hydrophila*, *Bacteroides type A*) που επικρατούσαν σε όλα τα χρυσόψαρα είτε αυτά σιτίζονταν με νεαρά σκουλήκια ή με σφαιρίδια ξηράς τροφής. Τα παραπάνω αποτέλεσμα της μελέτης οδήγησαν τους συγγραφείς στο συμπέρασμα ότι το εντερικό μικροβίωμα δεν επηρεάζεται από τις διατροφικές συνήθειες. Λόγω της μικρής διάρκειας του πειράματος υπήρξε συνέχεια το 1990 το οποίο ήρθε σε αντιπαράθεση με το προηγούμενο. όπως αναφέρουν οι Ringø et al. (2015) σε μελέτη που έκαναν επάνω στον Μπακαλιάρo του Ατλαντικού πουτα δείγματα σιτιστήκαν για περίπου έναν χρόνο με συμβατική τροφή απέδειξαν ότι η τροφή η οποία χορηγήθηκε στα δείγματα επηρέασε την μικροβιακή κοινότητα του εντέρου σε σχέση με άγρια άτομα τα οποία δεν σιτίζονταν τακτικά με συμβατική τροφή. Τέλος, οι ίδιοι συγγραφείς στην ίδια βιβλιογραφική αναφορά τους το 2015 αναφέρουν ακόμα μία έρευνα που αφορά την σχέση δίαιτας-μικροοργανισμών το 2012 και απευθύνεται στην επίδραση που έχουν τα μικροφύκη, εμπλουτισμένα στην τροφή, στους αλλόχθονους μικροοργανισμούς που εισέρχονται στο εσωτερικό ατόμων τσιπούρας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τροφές που ήταν εμπλουτισμένες προκάλεσαν εναλλαγές στις βακτηριακές κοινότητες και εξαιρετική μείωση σε συγκεκριμένα είδη βακτηρίων που βρίσκονταν εντός του εντέρου.

5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρεται και προηγουμένως κατά το πέρασμα των χρόνων έχουν βρεθεί διάφορες μοριακές τεχνικές για να μπορέσει να γίνει χειρισμός των μικροοργανισμών στο έντερο των ψαριών. Αυτό αφορά την υδατοκαλλιέργεια διότι έτσι πιστεύεται ότι θα υπάρξει βελτίωση της υδατοκαλλιέργειας με προώθηση νέων λειτουργικών ιχθυοτροφών. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί θεωρούνται ότι μπορούν να εξασφαλίσουν καλύτερο ανοσοποιητικό στο εκτρεφόμενο ψάρι, πράγμα που αν επιτευχθεί σε επιθυμητό βαθμό θα μπορέσει να εξαλείψει τα αντιβιοτικά τα οποία χορηγούνται πολλάκις αυτή την περίοδο σε πάρα πολλές εντατικές εκτροφές (Ghanbari et al.2015). Οι Heikkinen et al. (2006) αναφέρουν ότι στα θηλαστικά και στα πτηνά ζώα οι κοινότητες βακτηρίων αλληλεπιδρούν άμεσα με τον ξενιστή όπως και στα ψάρια. Στα ομοιόθερμα ζώα το μικροβίωμα μπορεί να επωφεληθεί μέσω προβιοτικών ή μέσω διάφορων άλλων σκευασμάτων που βοηθούν το ανοσοποιητικό των ζώων σε διάφορες εκτροφές. Οι υδατοκαλλιέργειες, παρατηρώντας τα πολλαπλά οφέλη που προσφέρουν τα προβιοτικά, θέλουν να επενδύσουν σε ιχθυοτροφές εμπλουτισμένες με προβιοτικούς μικροοργανισμούς. Τα συμπληρώματα αυτά υπόσχονται καλύτερη πέψη της τροφής και καλύτερη υγεία στο έντερο αν και ακόμα όλες οι έρευνες βρίσκονται σε νεαρό στάδιο και δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως οι μηχανισμοί των μικροοργανισμών αυτών καθώς και διάφορες παρενέργειες οι οποίες μπορεί να προκληθούν από την χορήγησή τους.

Βάση των αναφορών που έχουν γίνει στην παρούσα εργασία καθώς και από τα παραπάνω αποτελέσματα είμαστε σε θέση να πούμε ότι είναι ξεκάθαρο ότι η διατροφή μπορεί να επηρεάσει τις κοινότητες των βακτηρίων στο έντερο, πάραυτα είναι σκόπιμο να διερευνηθούν οι εναλλαγές των κοινοτήτων αυτών τι προκαλούν στον οργανισμό. Οι μεγάλες χρονικά αλλαγές που είναι δυνατόν να παρατηρηθούν στις διάφορες κοινότητες βακτηρίων ίσως να συνιστούν να μελετηθούν περαιτέρω και άλλοι παράγοντες όπως το στρες, η ηλικία ή και το στάδιο ανάπτυξης στο οποίο βρίσκεται ο κάθε οργανισμός όπως αναφέρουν οι Desai et al. (2012).

Εν κατακλείδι, στην παρούσα εργασία παρατηρήσαμε αλλαγές των κοινοτήτων και της αφθονίας των μικροοργανισμών έπειτα από ένα γεύμα, αλλά χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση για τον γαστρεντερικό σωλήνα των σαλμονοειδών και πως αυτός αντιδρά τις κοινότητες βακτηρίων που εισέρχονται μέσω των καθημερινών γευμάτων και σε διαφορετικές ιχθυοτροφές.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Α) ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alexandra Meziti, Alban Ramette, Eleni Mente & Konstantinos Ar. Kormas(2010). Temporal shifts of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) gut bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 472-484
2. Alexandra Meziti, Eleni Mente, Konstantinos Ar. Kormas(2012). Gut bacteria associated with different diets in reared *Nephrops norvegicus*. *Systematic and Applied Microbiology*
3. Ali Al-Hisnawi, Einar Ringø, Simon J Davies, Paul Wainnes, Graham Bradley & Daniel Lee Merrifield(2015). First report on the autochthonous gut microbiota of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus). *Aquaculture Research*, 46, 2962–2971
4. Arun Kumar Ray & Einar Ringo (2014). The Gastrointestinal Tract of Fish στο E. Ringo, D. Merrifield (2014). *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*. (σσ. 2-9). John Wiley & Sons, Ltd
5. Atul R. Desai, Matthew G. Links, Stephanie A. Collins, Graeme S. Mansfield, Murray D. Drew, Andrew G. Van Kessel, Janet E. Hill(2012). Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 350-353 (2012) 134–142.
6. Billard, R. (1985). Environmental factors in salmonid culture and the control of reproduction. In: *Salmonid Reproduction* (Ed. R. Iwamoto & S. Sower), Washington Sea Grant Program and University of Washington: 70-87
7. D L Merrifield, A Dimitroglou, G Bradley, R T M Baker and S J Davies(2009). Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*. 32, 755–766
8. E. Apper, D. Weissman, F. Respondek, A. Guyonvarch, F. Baron, P. Boisot, A. Rodiles, D.L. Merrifield(2016). Hydrolysed wheat gluten as part of a diet based on animal and plant proteins supports good growth performance of

- Asian seabass (*Lates calcarifer*), without impairing intestinal morphology or microbiota. *Aquaculture*. 453, 40–48
9. E. Ringo, S.K. Song(2016). Application of dietary supplements(synbiotics and probiotics in combination with plant products and β -glucans) in aquaculture. *Aquaculture Nutrition*. 22 ;4-24
 - 10.E. Ringo, Z. Zhou, J.L.G. Vecino, S. Wadsworth, J. Romero, A. Krogdahl, R.E. Olsen, A. Dimitroglou, A. Foey, S. Davies, M. Owen, H.L. Lauzon, L.L. Martinsen, P. De. Schryver, P. Bossier, S. Sperstad & D.L. Merrieffield(2015). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never ending story. *Aquaculture Nutrition*.
 11. Edsall, D.A., and Smith, C.E. (1991). Effect of oxygen supersaturation on rainbow trout fed with demand feeders. *Progressive Fish Culture*, 53:95-97.
 12. François-Joël Gatesoupe, Christine Huelvan , Nicolas Le Bayon , Armelle Sévère , Inga Marie Aasen ,Kristin F. Degnes , David Mazurais , Stéphane Panserat , José L. Zambonino-Infante , Sadasivam J. Kaushik(2013). The effects of dietary carbohydrate sources and forms on metabolic response and intestinal microbiota in sea bass juveniles, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 422–423 (2014) 47–53.
 13. Graeme S. Mansfield, Atul R. Desai, Stephanie A. Nilson, Andrew G. Van Kessel, Murray D. Drew a, Janet E. Hill(2010). Characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal microbiota and inflammatory marker gene expression in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture* 307 (2010) 95–104
 14. Hammer, Ø., D. Harper, and P. Ryan. 2001. PAST:paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electr.* 4:9.
 15. Jaime Romero, Einar Ringo & Daniel L. Merrifield (2014). The Gut Microbiota of Fish. In: E. Ringo, D. Merrifield (2014). *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*. (pp. 75-83). John Wiley & Sons, Ltd
 16. Jouni Heikkinen, Jouni Vielma, Outi Kemiläinen, Marja Tirola,
 17. Mahdi Ghanbari ,Wolfgang Kneifel , Konrad J. Domig(2015). A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*

18. Maria Befring Hovda, Bjørn Tore Lunestad, Ramon Fontanillas, Jan Thomas Rosnes(2007). Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 272. 581–588
19. Miray Etyemez, José Luis Balcázar(2015). Bacterial community structure in the intestinal ecosystem of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. Research in Veterinary Science.
- Päivi Eskelinen, Tapio Kiuru, Dina Navia-Paldanius, Atte von Wright(2006). Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 261 (2006) 259–268
20. Shangong Wu, Guitang Wang, Esther R. Angert, Weiwei Wang, Wenxiang Li, Hong Zou(2012). Composition, Diversity, and Origin of the Bacterial Community in Grass Carp Intestine. Plos One. Volume 7. 2. e30440
21. Tzong-Der Tzeng, Yueh-Yang Pao, Po-Cheng Chen, Francis Cheng-Hsuan Weng, Wen Dar Jean, Daryi Wang(2015). Effects of Host Phylogeny and Habitats on Gut Microbiomes of Oriental River Prawn(*Macrobrachium nipponense*). Plos One. 10(7): e0132860.
22. Zar, J.H.,1984. Biostatistical Analysis 2nd edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs,UK.

B) ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Konstantinos A. Kormas, Alexandra Meziti, Eleni Mente & Athanasios Frentzos(2014). Dietary differences are reflected on the gut prokaryotic community structure of wild and commercially reared sea bream (*Sparus aurata*). Microbiology Open. 3(5): 718–728.
2. Κλαουδάτος Σ.(2012). Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών. Εκδόσεις Προπομπός.(σς 56-62) Αθήνα 2012.
3. Κορμάς, Κ. & Μεζίτη, Α. (2011) Ο ρόλος των μικροοργανισμών στην εκτροφή των δεκαπόδων. Στο Ε. Μεντέ & Ι. Νέγκας (Επιμ.), Στοιχεία φυσιολογίας θρέψεως και εφαρμοσμένη διατροφή ιχθύων και καρκινοειδών (σς. 359 - 376). Αθήνα: Εκδόσεις Παπαζήση

4. Νεοφύτου, Χ.Ν. (1997). Ιχθυολογία. (σσ 212). University Studio Press. Θεσσαλονίκη 2004.
5. Παπουτσόγλου Σ. (2008). Διατροφή Ιχθύων. Εκδόσεις Σταμούλη. Αθήνα 2008.
6. Πάσχος, Γ. (2002). Ιχθυοκαλλιέργειες Εσωτερικών Υδάτων. Σολομοειδή. Κυπρινοειδή. Στουργιόνια. Διακοσμητικά. Γατόψαρα. Στοιχεία γενετικής. (σσ 293)Ιωάννινα, 2002.
7. Φώτης, Γ. (2003). Εκτροφή και παθολογία ιχθύων. Τόμος Α'. (Υδάτινο περιβάλλον, Στοιχεία ιχθυολογίας, Ιχθυοτροφία και Ιχθυοπαθολογία). (σς 131, 154-155). Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία. Θεσσαλονίκη 2003.

Γ) ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Fishbase.org

http://ec.europa.eu/fisheries/documentation/publications/factsheets-aquaculture-species/trout_el.pdf